SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.C116

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いたステロイドホルモンの定量分析

Quantitative Analysis of Steroid Hormones Using Triple Quadrupole LC/MS/MS

ステロイドホルモンは代謝，神経伝達，細胞内シグナル伝達などの制御に大きく関与しています。さらにステロイドの変化が鎮静作用や発作の予防だけでなく，がんや再生医療など幅広い領域で効果があることが確認されています。生体試料から多くのステロイドを定量することにより様々な知見を得ることが可能となります。

本アプリケーションニュースでは，前処理に ISOLUTE® SLE+ を使用し，ヒト血清中のステロイドホルモンの LC/MS/MS 分析についてご紹介します。

T. Tanigawa　T. Minohata

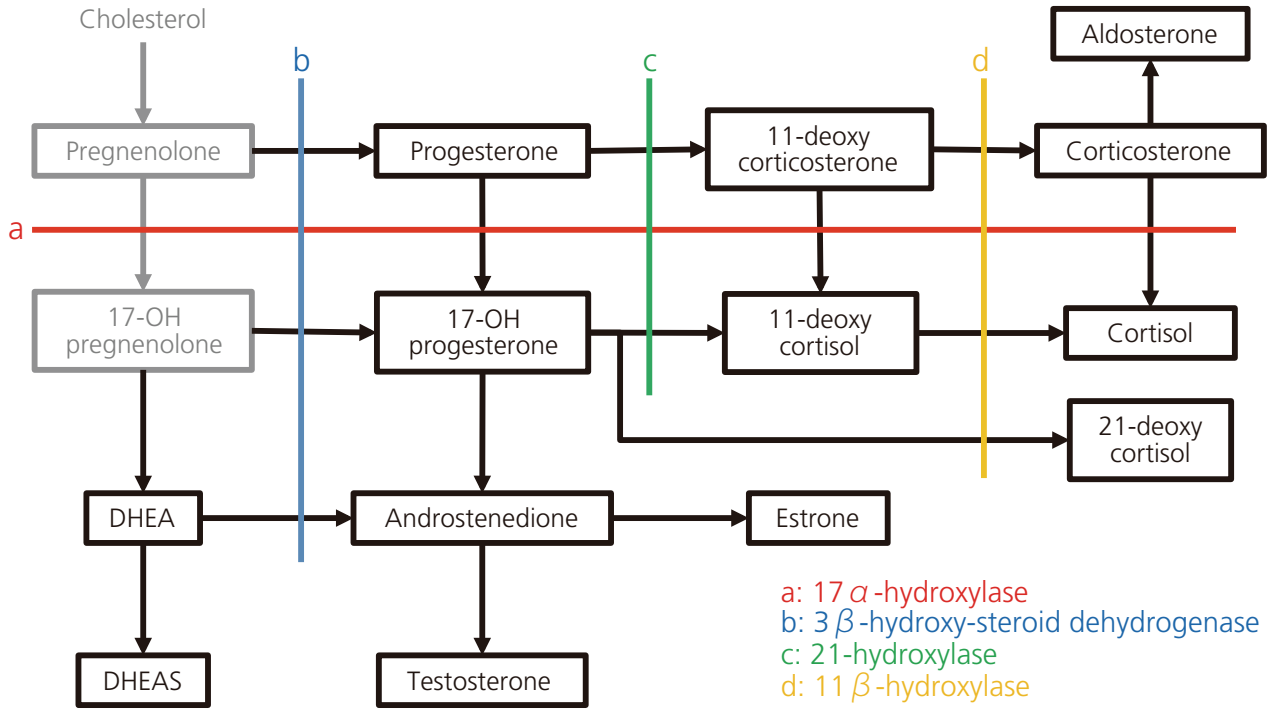


Fig. 1　ステロイド生合成の主要経路
Major Pathways of Steroid Biosynthesis

Table 1　分析条件
Analytical Contditions

[LC] NexeraX2 System	
Column	: Shim-Pack FC-ODS (75 mm L. × 2 mm I.D., 3 µm)
Column Oven	: 40 ˚C
Mobile Phase A	: 5 mM Ammonium Formate - Water
Mobile Phase B	: 5 mM Ammonium Formate - Methanol
Gradient	: 35 %B (0-2.5 min) - 35 %B - 45 %B (2.5-4 min) - 45 %B - 80 %B (4-12 min) 95 %B (12.01-15 min) - 35 %B (15.01-18 min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Injection Volume	: 10 µL
[MS] LCMS-8050	
Ionization	: ESI
DL Temp.	: 110 ˚C
Heat Block Temp.	: 450 ˚C
Interface Temp.	: 370 ˚C
Nebulizer Gas	: 3 L/min
Drying Gas	: 7 L/min
Heating Gas	: 13 L/min

MRM parameter：

Compound Name	Group	Ret. Time (min)	Precursor *m/z*	Product *m/z* (1)	Product *m/z* (2)	Compound Name	Group	Ret. Time (min)	Precursor *m/z*	Product *m/z* (1)	Product *m/z* (2)
Aldosterone	1	5.52	361.20	315.20	343.00	Androstenedione	6	8.83	287.10	97.10	109.15
Aldosterone IS	1	5.47	367.20	349.25	331.10	Androstenedione IS	6	8.79	292.10	100.10	113.05
Cortisol	2	6.55	363.40	121.10	97.00	Testosterone	7	9.46	289.10	97.15	109.05
Cortisol IS	2	6.57	366.10	121.10	97.10	Testosterone IS	7	9.42	294.10	100.00	113.05
DHEAS	3	7.21	271.20	213.20	197.10	DHEA	8	9.03	271.20	213.20	253.15
DHEAS IS	3	7.18	277.10	219.20	203.10	Estrone	8	9.04	271.10	133.05	157.05
21-Deoxycortisol	4	7.46	347.20	311.20	121.05	11-Deoxycorticosterone	8	9.22	331.20	109.05	97.05
Coricosterone	4	7.84	347.20	121.15	97.15	17-OHP	8	9.72	331.10	97.00	109.00
Coricosterone IS	4	7.77	355.20	125.05	337.00	17-OHP IS	8	9.66	339.10	100.05	113.10
11-Deoxycortisol	5	8.04	347.20	109.10	97.05	Progesterone	9	11.34	315.20	97.05	109.10
11-Deoxycortisol IS	5	8.01	352.20	100.15	113.05	Progesterone IS	9	11.26	324.10	100.00	113.00
						DHEAS_neg	10	7.20	367.10	97.10	
						DHEAS_neg IS	10	7.17	373.10	98.00	

Type	Event#	+/−	Compound Name m/z	Time (4.653 min – 12.331 min)
MRM	1	+	Aldosterone IS 367.20>349.25, 367.20>331.10	
MRM	2	+	Aldosterone 361.20>343.00, 361.20>315.20	
MRM	3	+	Cortisol IS 366.10>121.10, 366.10>97.10	
MRM	4	+	Cortisol 363.40>121.10, 363.40>97.00	
MRM	5	+	DHEAS 271.20>213.20, 271.20>197.10	
MRM	6	+	DHEAS IS 277.10>219.20, 277.10>203.10	
MRM	7	+	21-Deoxycortisol 347.20>311.20, 347.20>121.05	
MRM	8	+	Coricosterone IS 355.20>125.05, 355.20>337.00	
MRM	9	+	Coricosterone 347.20>121.15, 347.20>97.15	
MRM	10	+	11-Deoxycortisol 347.20>109.10, 347.20>97.05	
MRM	11	+	11-Deoxycortisol IS 352.20>100.15, 352.20>113.05	
MRM	12	+	Androstenedione IS 292.10>100.10, 292.10>113.05	
MRM	13	+	Androstenedione 287.10>97.10, 287.10>109.15	
MRM	14	+	Estrone 271.10>133.05, 271.10>157.05	
MRM	15	+	DHEA 271.20>253.15, 271.20>213.20	
MRM	16	+	11-Deoxycorticosterone 331.20>109.05, 331.20>97.05	
MRM	17	+	Testosterone 289.10>97.15, 289.10>109.05	
MRM	18	+	Testosterone IS 294.10>100.00, 294.10>113.05	
MRM	19	+	17-OHP 331.10>97.00, 331.10>109.00	
MRM	20	+	17-OHP IS 339.10>100.05, 339.10>113.10	
MRM	21	+	Progesterone 315.20>97.05, 315.20>109.10	
MRM	22	+	Progesterone IS 324.10>100.00, 324.10>113.00	
MRM	23	−	DHEAS_neg IS 373.10>98.00	
MRM	24	−	DHEAS_neg 367.10>97.10	

■検量線

Standard Curve

13 種類のステロイドホルモンについて MRM 測定を実施しました。混合標準溶液を用いて得られた検量線と各ステロイドの LOQ 付近の濃度について MRM クロマトグラムを Fig. 2 に示します。

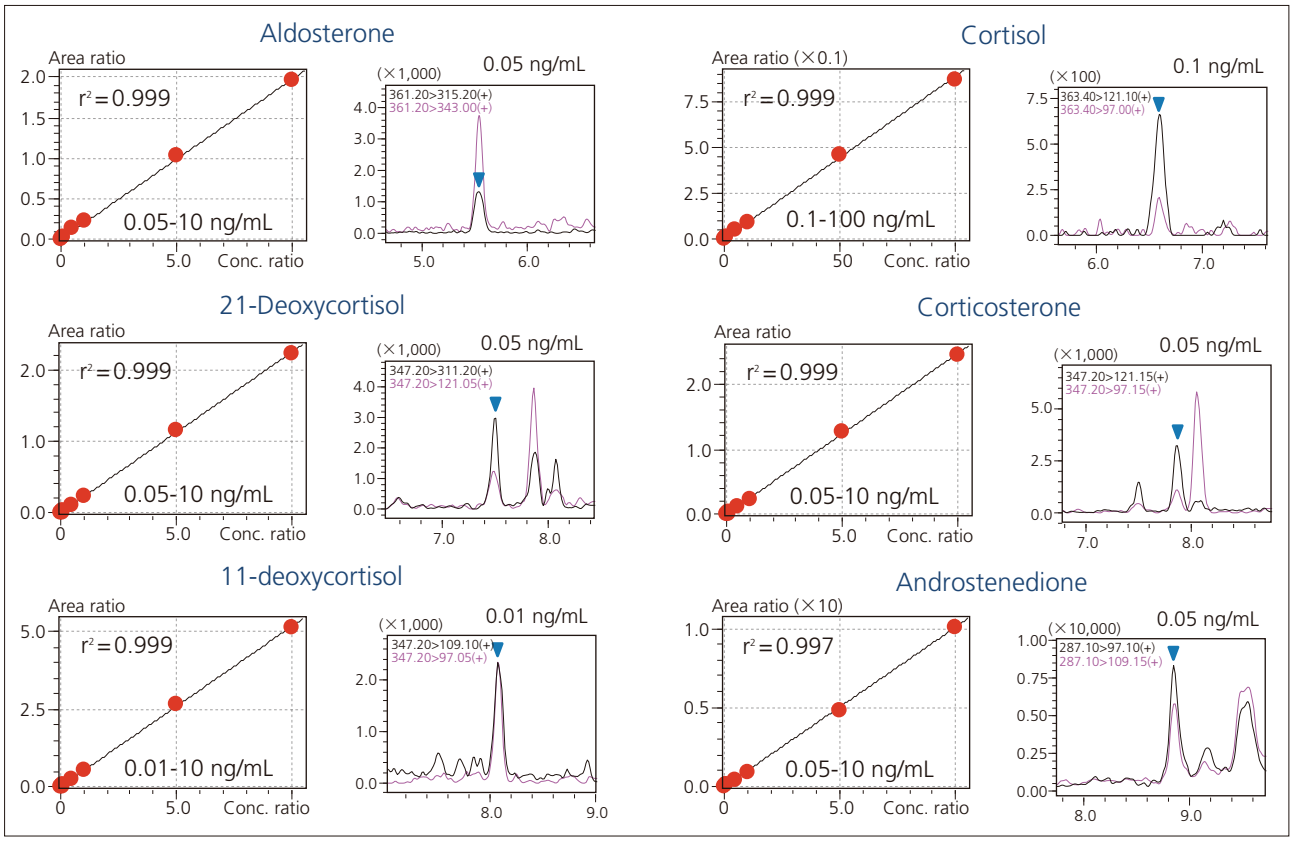
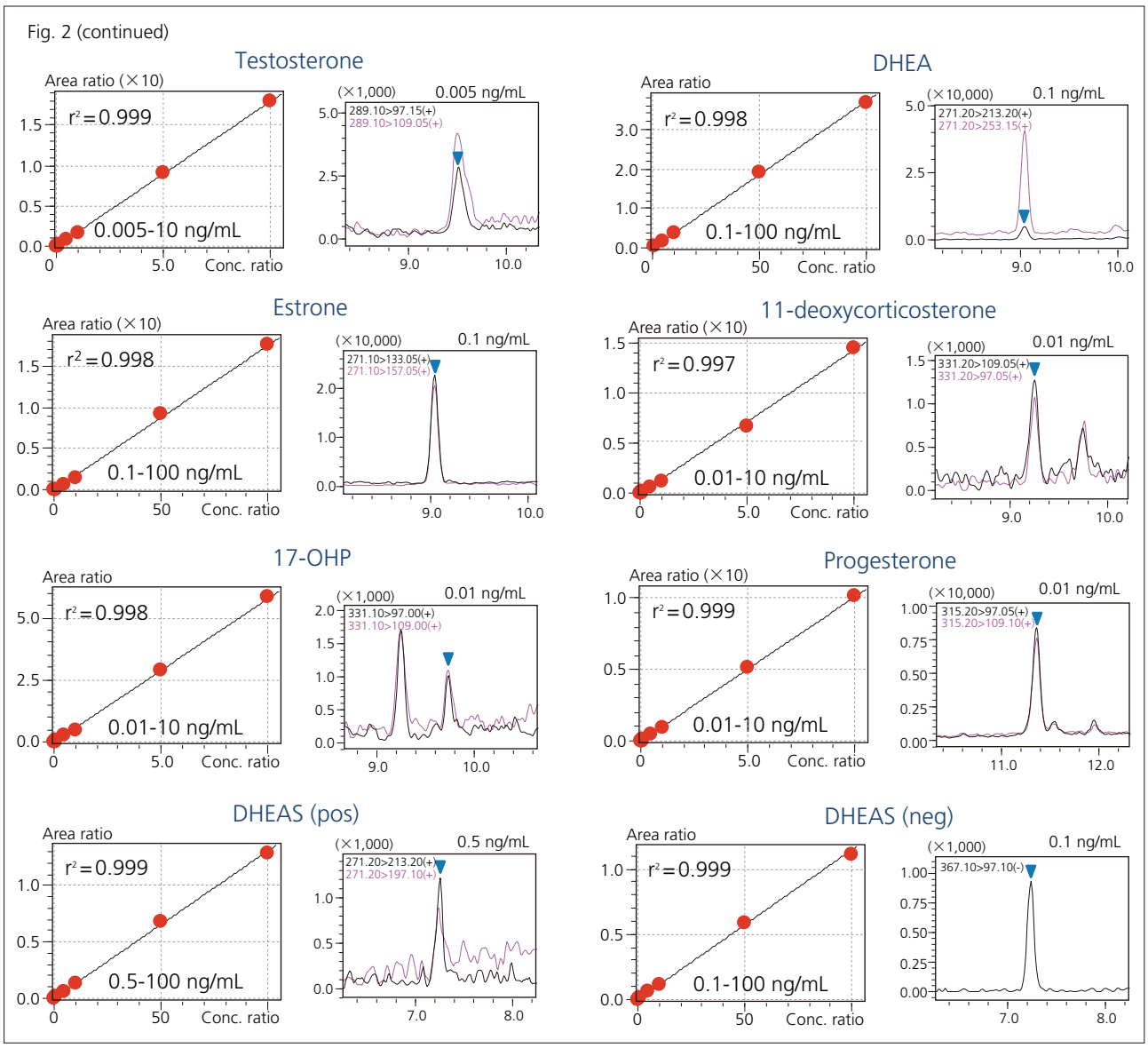


Fig. 2　ステロイドホルモン 13 種類の検量線と MRM クロマトグラム
Calibration Curves and MRM chromatograms of 13 Steroid Hormones



■ISOLUTE® SLE+ を用いたサンプル調製

Sample Preparation Using ISOLUTE® SLE+

生体由来のサンプルにおいて前処理は非常に重要です。タンパク質やリン脂質，塩のようなマトリックスの影響を除去し，より定量性に優れた分析を行うために ISOLUTE® SLE+ を使用しました。血清からのステロイドホルモン抽出方法を以下に示しました。

1. サンプル前処理：
   血清サンプル（100 µL）を HPLC グレードの超純水（300 µL）で希釈，混合する。
2. サンプルロード：
   プレートに前処理を行ったサンプル（400 µL）をロードし，加圧することで導入する。5 分間静置し，珪藻土に吸収させる。
3. アナライトの溶出：
   ディープウエルプレートにジクロロメタン（900 µL × 2）を加えて溶出する。5 分間，自然落下を行った後，加圧することで溶出する。
4. 抽出後の処理：
   ガラスバイアルに溶出液を移し，40 ℃ で蒸発乾固を行う。100 µL の溶媒（65 % 移動相 A，35 % 移動相 B，v/v）で再溶解し，遠心後，上清を新しいプレートに移す。

ステロイドホルモン 12 種類について，血清にスパイクした濃度範囲，回収率，マトリックス効果を Table 2 に示しました。分析の回収率は血清に予めステロイドを添加したものを前処理したサンプル [B] と血清のみを前処理した後にステロイドを添加したサンプル [A] の面積値を比較することで決定しました。マトリックスファクターは [A] と標準溶液 [S] の面積値を比較することで決定しました。

Table 2　12 ステロイドホルモンの回収率とマトリックスファクター（n=3）
Recovery and Matrix Factor of 12 steroid Hormones (n=3)

Compound	Concentration range spiked to serum (ng/mL)	Recovery %	Matrix Factor
Aldosterone	0.05-10	94.8 %	0.13
Cortisol	0.1-100	94.7 %	0.31
21-Deoxycortisol	0.05-10	94.6 %	0.13
Coricosterone	0.05-10	107.1 %	0.30
11-Deoxycortisol	0.01-10	93.7 %	0.21
Androstenedione	0.05-10	94.2 %	0.09
Testosterone	0.005-10	80.2 %	0.00
DHEA	0.1-100	89.8 %	0.19
Estrone	0.1-100	94.3 %	0.30
11-Deoxycorticosterone	0.01-10	96.2 %	0.26
17-OHP	0.01-10	94.6 %	0.19
Progesterone	0.01-10	89.8 %	0.19

回収率とマトリックスファクターは以下の計算式にしたがって求めました。
Recovery = [B]/[A] × 100　　Matrix Factor = 1 - [A]/[S]

■イオンペア試薬の使用

Use of Ion Pair Reagents

イオンペア試薬は回収率の得にくいイオン性化合物を分析する際に有効なアプローチになります。DHEAS については，サンプル前処理時にイオンペア試薬（25 mM ジブチルアンモニウム酢酸）を添加することで高い回収率が得られることを確認しました。

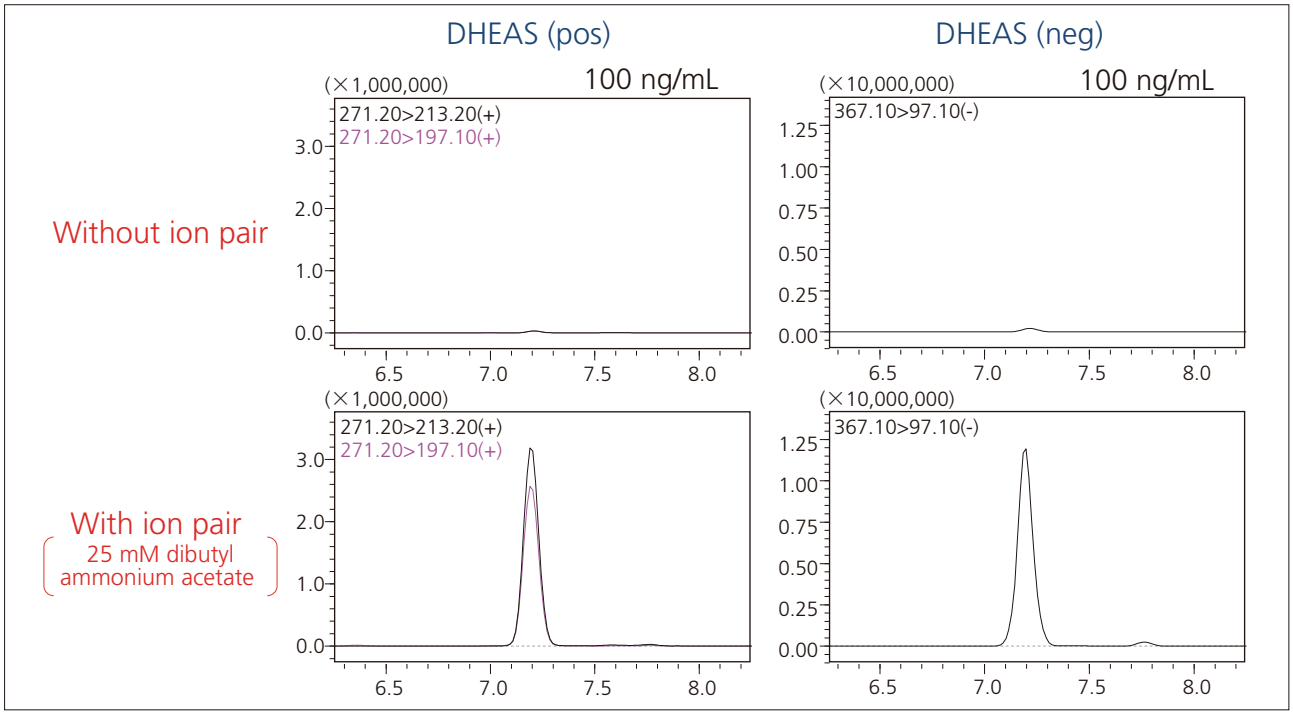


Fig. 3　イオンペア試薬の有無による DHEAS の MRM クロマトグラム比較
Comparative MRM Chromatograms of DHEAS Illustrating the Use of Ion Pairing Reagents

Table 3　DHEA の回収率とマトリックスファクター（n=3）
Recovery and Matrix Factor of DHEAS (n=3)

Compound	Concentration range spiked to serum (ng/mL)	Recovery %	Matrix Factor
DHEAS (pos)	0.1-100	86.2 %	0.06
DHEAS (neg)	0.1-100	89.3 %	0.11

〈謝辞〉
本アプリケーションニュースは，バイオタージ・ジャパン株式会社のご協力により作成いたしました。深く感謝申し上げます。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2015年7月

島津コールセンター　0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-06501-480IK
2015.7